



EP00109245

REC'D 27 OCT 2000	
WIPO	PCT

4

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Aktenzeichen:

199 47 490.7

Anmeldetag:

1. Oktober 1999

Anmelder/Inhaber:

BASF AG, Ludwigshafen/DE

Bezeichnung:

GMP-Synthetase aus Pflanzen

IPC:

C 07 H, C 12 N, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 21. August 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Waasmaier

Waasmaier

Patentansprüche

1. DNA-Sequenz, enthaltend die Kodierregion einer pflanzlichen GMP-Synthetase, dadurch gekennzeichnet, daß diese DNA-Sequenz die Nukleotidabfolge SEQ-ID No: 1 oder SEQ-ID No: 3 aufweist.
2. DNA-Sequenzen, die mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO: 1 oder SEQ-ID No: 3 gemäß Anspruch 1 oder Teilen davon oder Derivaten, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von diesen Sequenzen abgeleitet sind, hybridisieren und für ein Protein kodieren, das die biologische Aktivität einer GMP-Synthetase besitzt.
3. Protein mit GMP-Synthetase-Aktivität, enthaltend eine Aminosäuresequenz, die eine Teilsequenz von mindestens 100 Aminosäuren aus SEQ-ID NO: 2 oder 4 darstellt.
4. Protein nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es als Aminosäuresequenz die Teilsequenz 50 - 300 aus SEQ-ID NO: 2 oder SEQ-ID No: 4 enthält.
5. Protein nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß es als Aminosäuresequenz die in SEQ-ID NO: 2 oder SEQ-ID No: 4 dargestellte Sequenz enthält.
6. Verwendung einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 zur Einführung in pro- oder eukaryontische Zellen, wobei diese Sequenz gegebenenfalls mit Steuerelementen, die die Transkription und Translation in den Zellen gewährleisten, verknüpft ist und zur Expression einer translatierbaren mRNA, die die Synthese einer pflanzlichen GMP-Synthetase bewirkt, führt.
7. Verwendung einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der pflanzlichen GMP-Synthetase mit herbizider Wirkung.
8. Testsystem basierend auf der Expression einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 nach Anspruch 1 oder 2 zur Identifizierung von Inhibitoren der pflanzlichen GMP-Synthetase mit herbizider Wirkung.

2

9. Pflanze mit modifiziertem Gehalt an Guanosinnukleotiden hergestellt nach Expression einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder 3 nach Anspruch 1 oder 2 in Sense- oder Antisense-Orientierung.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

GMP-Synthetase aus Pflanzen

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Identifizierung pflanzlicher GMP-Synthetase (Guanosinmonophosphat-Synthetase) als neues Ziel für herbizide Wirkstoffe. Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin DNA-Sequenzen kodierend für ein Polypeptid mit GMP-

- 10 Synthetase (EC 6.3.5.2)- Aktivität. Zudem betrifft die Erfindung die Verwendung einer Nukleinsäure kodierend für ein Protein mit GMP-Synthetase-Aktivität pflanzlichen Ursprungs zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der GMP-Synthetase mit herbizider Wirkung. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung der Nukleinsäure kodierend für pflanzliche GMP-Synthetase zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der GMP-Synthetase, sowie zur Herstellung von Pflanzen mit modifiziertem Gehalt an Guanosinnukleotiden.

20

Pflanzen sind in der Lage, aus Kohlendioxid, Wasser und anorganischen Salzen ihre Zellkomponenten zu synthetisieren.

- Dieser Prozeß ist nur möglich, indem biochemische Reaktionen zum Aufbau organischer Substanzen genutzt werden. Pflanzen müssen die Nukleotide als Bestandteile der Nukleinsäuren de novo synthetisieren.

- Nukleotide müssen als Bestandteile der Nukleinsäuren DNA und RNA insbesondere in schnell wachsenden Geweben der Pflanzen über mehrstufige Stoffwechselwege synthetisiert werden. Nukleotide sind ferner in nahezu alle Stoffwechselwegen eingebunden. Nucleosidtriphosphate, vor allem ATP, treiben viele energieaufwändige Reaktionen der Zelle. Adeninnukleotide tauchen darüber hinaus auch als Komponente in essentiellen Coenzymen wie Coenzym A sowie Nicotinamid- und Flavin-Coenzymen auf, die an vielen zellulären Umsetzungen beteiligt sind. Guanosinnukleotide geben diversen zellulären Prozessen, wie Proteintranslation, Microtubuli-Assemblierung, vesikulärem Transport, Signaltransduktion und Zellteilung eine Reaktionsrichtung. Ferner stellen Nukleotide die Ausgangsmetabolite zur Biosynthese von Methylxanthinen, wie Coffein und Theobromin insbesondere in Pflanzenfamilien der Rubiaceae und Theaceae dar.

- 45 Purinnukleotide werden in Mikroorganismen, Tieren und Pflanzen de novo auf gleiche Weise ausgehend von Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) gebildet. In einer 10-stufigen Reaktionsfolge wird IMP

2

synthetisiert. IMP kann in Folgereaktionen durch Adenylosuccinat-Synthetase und Adenylosuccinat-Lyase zum AMP umgesetzt werden. Zur Synthese von GMP wird IMP zunächst durch die IMP-Dehydrogenase zum XMP umgesetzt, welches durch die GMP-Synthetase zum GMP 5 aminiert wird, siehe Abb. 1.

Gene, die für GMP-Synthetase kodieren, wurden aus verschiedenen Organismen isoliert.

- 10 Die Kompartimentierung des Purinbiosynthesewegs in Pflanzen wurde bisher nur wenig untersucht. Der in den Wurzelknöllchen der Leguminosen in Form von Glutamin und Aspartat fixierte Stickstoff wird über den de novo Syntheseweg zunächst in Purine überführt. In den Wurzelknöllchen von *Glycine max* und *Vigna unguiculata* L., 15 ist dieser Weg in den Plastiden lokalisiert (Boland and Schubert, Arch. Biochem. Biophys. 220 (1983), 179-187; Shelp et al., Arch. Biochem. Biophys. 224 (1983), 429-441). Neueren Untersuchungen zufolge sind Enzymaktivitäten des Purinbiosynthesewegs in den Wurzelknöllchen von *Vigna unguiculata* zudem jedoch auch in Mito- 20 chondrien zu finden (Atkins et al., Plant Physiology 113 (1997), 127-135; Smith et al., Plant Molecular Biology 36 (1998), 811-820).

- Die Regulation dieses Synthesewegs wurde bislang nur in Mikroor- 25 ganismen und Tieren untersucht und umfaßt Transkriptionskontrolle, Endproduktinhibierung und allosterische Regulation. Eine Schlüsselstellung im tierischen, als auch pflanzlichen System wird dem Enzym PRPP-Amidotransferase (PRPP-ATase) des zweiten Reaktionssschritts zugeschrieben, welches durch die Endprodukte IMP, 30 AMP und GMP allosterisch reguliert wird (Reynolds et al., Archives of Biochemistry and Biophysics 229 (1984), 623-631).

- Die GMP-Synthetase spielt auch hinsichtlich einer balancierten Synthese von Guanosinnukleotiden und Adenosinnukleotiden eine 35 Rolle, da ATP ein Substrat der GMP-Synthetase ist.

- Da Pflanzen auf einen funktionierenden Nukleotidstoffwechsel angewiesen sind, bietet sich dieser Stoffwechsel als mögliches Ziel für neue Herbizide an. Tatsächlich wurden bereits Wirkstoffe be- 40 schrieben, die inhibierend auf Enzyme der de novo Purinbiosynthese wirken. Beispielhaft ist 5'-Phosphohydanthocidin zu nennen, welches ein Enzym des pflanzlichen Purin-Stoffwechsels, die Adenylosuccinat-Synthetase (ASS), inhibiert (Siehl et al., Plant Physiol. 110 (1996), 753-758). Ferner existieren Inhibitoren für 45 Enzyme dieses Stoffwechselweges aus Tieren und Mikroorganismen. Folat-Analoga inhibieren diverse Folat-abhängige Reaktionen, unter anderem das Enzym GAR-Transformylase und wirken antiprolif-

3

ferativ, antiinflammatorisch und immunsuppressiv. Mycophenolat (MPA) wirkt als Hemmstoff der IMP-Dehydrogenase antimikrobiell, antiviral und immunsuppressiv (Kitchin et al., Journal of the American Academy of Dermatology 37 (1997), 445-449).

5

Der Nachweis der Eignung eines Enzyms als Herbizid-Target kann zum Beispiel durch Verringerung der Enzymaktivität mittels der Antisensetechnik in transgenen Pflanzen gezeigt werden. Wird auf diese Weise ein verringertes Wachstum bewirkt, so läßt sich damit
10 auf eine Eignung des in seiner Aktivität reduzierten Enzyms als Wirkort für herbizide Wirkstoffe schließen. Beispielhaft wurde dies für die Acetolactat-Synthase an transgenen Kartoffelpflanzen gezeigt (Höfgen et al., Plant Physiology 107 (1995), 469-477).

15 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es zu belegen, daß GMP-Synthetase in Pflanzen ein geeignetes herbizides Target ist, die Isolierung einer vollständigen pflanzlichen cDNA kodierend für das Enzym GMP-Synthetase und deren funktionelle Expression in bakteriellen oder eukaryontischen Zellen, sowie die Herstellung
20 eines effizienten und einfachen GMP-Synthetase Testsystems für die Durchführung von Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien.

Die Aufgabe wurde gelöst durch Isolierung eines für das pflanzliche Enzym GMP-Synthetase kodierenden Gens, der Herstellung von
25 Antisensekonstrukten der GMP-Synthetase, sowie der funktionellen Expression der GMP-Synthetase in bakteriellen oder eukaryontischen Zellen.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Isolierung
30 einer Vollängen-cDNA codierend für eine funktionelle Glutamin-hydrolysierende GMP-Synthetase (EC 6.3.5.2.) aus Tabak (*Nicotiana tabacum*).

Ein erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine DNA-Se-
35 quenz SEQ-ID NO:1 enthaltend die Kodierregion einer pflanzlichen GMP-Synthetase aus Tabak, siehe Beispiel 1.

Ein anderer Gegenstand der Erfindung ist eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 enthaltend einen Teil der Kodierregion einer pflanzlichen
40 GMP-Synthetase aus *Physcomitrella patens*, siehe Beispiel 2.

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind DNA-Sequenzen, die von SEQ-ID NO: 1 oder SEQ-ID No: 3 abgeleitet sind oder mit einer dieser Sequenzen hybridisieren und die für ein Protein kodieren,
45 das die biologische Aktivität einer GMP-Synthetase besitzt.

4

Tabakpflanzen der Linie *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN, die ein Antisensekonstrukt der GMP-Synthetase tragen, wurden näher charakterisiert. Die Pflanzen zeigen in unterschiedlichem Maße eine Wachstumsretardierung. Die transgenen Linien sowie die Nachkommen
5 als 1. und 2. Generation wiesen ein verringertes Wachstum in Erde auf. In Pflanzen mit verringertem Wachstum konnte eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte GMP-7M RNA-Menge in der Northern-Hybridisierung detektiert werden. Ferner konnte im Western-blot Experiment eine im Vergleich mit Wildtyppflanzen verringerte
10 Menge der GMP-Synthetase in den transgenen Linien detektiert werden, siehe Beispiel 7. Es läßt sich eine Korrelation zwischen Wachstumsretardierung und Reduktion der GMP-Synthetase Proteinmenge feststellen. Dieser klare Zusammenhang weist GMP-Synthetase erstmals eindeutig als geeignetes Zielprotein für herbizide Wirk-
15 stoffe aus.

Um effiziente Hemmstoffe der pflanzlichen GMP-Synthetase finden zu können, ist es notwendig, geeignete Testsysteme, mit denen Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien durchgeführt werden können, zur
20 Verfügung zu stellen. Hierzu wird beispielsweise die komplette cDNA-Sequenz der GMP-Synthetase aus Tabak in einen Expressionsvektor (pQE, Qiagen) kloniert und in *E. coli* überexprimiert, siehe Beispiel 4.

25 Alternativ kann jedoch die Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 beispielsweise in anderen Bakterien, in Hefen, Pilzen, Algen, Pflanzenzellen, Insektenzellen oder Säugerzellen exprimiert werden, siehe Beispiel 5.

30 Das mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionskassette exprimierte GMP-Synthetase-Protein eignet sich besonders zur Auffindung von für die GMP-Synthetase spezifischen Hemmstoffen.

Dazu kann die pflanzliche GMP-Synthetase beispielsweise in einem
35 Enzymtest eingesetzt werden, bei dem die Aktivität der GMP-Synthetase in An- und Abwesenheit des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich der beiden Aktivitätsbestimmungen läßt sich eine qualitative und quantitative Aussage über das Hemmverhalten des zu testenden Wirkstoffes machen, siehe Bei-
40 spiel 8.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf herbizide Eigenschaften überprüft werden. Das Verfahren gestattet es, repro-
45 duzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt solche mit großer Wirkstärke auszuwählen, um mit diesen Substanzen an-

5

schließlich weitere, dem Fachmann geläufige vertiefte Prüfungen durchzuführen.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen mit
5 herbizider Wirkung, die mit dem oben beschriebenen Testsystem identifizierbar sind.

- Inhibitoren der GMP-Synthetase mit herbizider Wirkung können als Defolianten, Desiccants, Krautabtötungsmittel und insbesondere als
10 Unkrautvernichtungsmittel verwendet werden. Unter Unkraut im weitesten Sinne sind alle Pflanzen zu verstehen, die an Orten aufwachsen, an denen sie unerwünscht sind. Ob die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems gefundenen Wirkstoffe als totale oder selektive Herbizide wirken, hängt unter anderem von der an-
15 gewandten Menge ab.

Inhibitoren der GMP-Synthetase mit herbizider Wirkung können beispielsweise gegen folgende Unkräuter verwendet werden:

- 20 Dikotyle Unkräuter der Gattungen:
Sinapis, Lepidium, Galium, Stellaria, Matricaria, Anthemis, Galinsoga, Chenopodium, Urtica, Senecio, Amaranthus, Portulaca, Xanthium, Convolvulus, Ipomoea, Polygonum, Sesbania, Ambrosia, Cirsium, Carduus, Sonchus, Solanum, Rorippa, Rotala, Lindernia,
25 Lamium, Veronica, Abutilon, Emex, Datura, Viola, Galeopsis, Papaver, Centaurea, Trifolium, Ranunculus, Taraxacum.

Monokotyle Unkräuter der Gattungen:

- Echinochloa, Setaria, Panicum, Digitaria, Phleum, Poa, Festuca,
30 Eleusine, Brachiaria, Lolium, Bromus, Avena, Cyperus, Sorghum, Agropyron, Cynodon, Monochoria, Fimbristylis, Sagittaria, Eleocharis, Scirpus, Paspalum, Ischaemum, Sphenoclea, Dactyloctenium, Agrostis, Alopecurus, Apera.

- 35 Gegenstand der Erfindung sind auch Expressionskassetten, deren Sequenz für eine GMP-Synthetase aus Tabak oder deren funktionelles Äquivalent kodieren. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder eine cDNA-Sequenz sein.

- 40 Gegenstand der Erfindung ist auch eine Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 kodierend für einen Teil der pflanzlichen GMP-Synthetase aus *Physcomitrella patens*.

- Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten beinhalten außerdem
45 regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine erfindungsgemäße Expressions-

6

kassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das GMP-Synthetase-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulatorischer Elemente derart, daß jedes der regulatorischen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

Die Herstellung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten GMP-Synthetase-DNA Sequenz und einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Gegenstand der Erfindung sind auch funktionell äquivalente DNA-Sequenzen, die für ein GMP-Synthetase-Gen kodieren und die bezogen auf die Gesamtlänge der DNA-Sequenz eine Sequenzhomologie mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO: 1 oder SEQ-ID No. 3 von 40 bis 100 % aufweisen.

30

Bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind funktionell äquivalente DNA-Sequenzen, die für ein GMP-Synthetase-Gen kodieren und die bezogen auf die Gesamtlänge der DNA-Sequenz eine Sequenzhomologie mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO: 1 oder SEQ-ID No. 3 von 60 bis 100 % aufweisen.

Besonders bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind funktionell äquivalente DNA-Sequenzen, die für ein GMP-Synthetase-Gen kodieren und die bezogen auf die Gesamtlänge der DNA-Sequenz eine Sequenzhomologie mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO: 1 oder SEQ-ID No. 3 von 80 bis 100 % aufweisen.

Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein GMP-Synthetase-Gen kodieren, sind erfindungsgemäß solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstli-

che, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch einer Pflanze angepaßte, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere
5 auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für eine GMP-Synthetase kodierende Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigt. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden
10 beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation dieser Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-
15 Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

20

Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel der Herstellung von ausreichenden Mengen des Enzyms GMP-Synthetase eingesetzt werden.

25

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Protein aus Tabak gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz SEQ-ID NO: 2 bzw. Derivate oder Teile dieses Proteins mit GMP-Synthetase Aktivität.

30 Gegenstand der Erfindung sind auch pflanzliche Proteine mit GMP-Synthetase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der Tabak GMP-Synthetase von 20 - 100 % Identität.

Bevorzugt sind pflanzliche Proteine mit GMP-Synthetase Aktivität
35 mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der Tabak GMP-Synthetase von 50 - 100 % Identität.

Besonders bevorzugt sind pflanzliche Proteine mit GMP-Synthetase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der Tabak GMP-
40 Synthetase von 80 - 100 % Identität.

Gegenstand der Erfindung sind auch pflanzliche Proteine mit GMP-Synthetase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der Physcomitrella patens GMP-Synthetase von 20 - 100 % Identität.

45

8

Bevorzugt sind pflanzliche Proteine mit GMP-Synthetase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der Physcomitrella patens GMP-Synthetase von 50 - 100 % Identität.

- 5 Besonders bevorzugt sind pflanzliche Proteine mit GMP-Synthetase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der Physcomitrella patens GMP-Synthetase von 80 - 100 % Identität.

- Weitere Aufgabe der Erfindung war die Überexpression des GMP-Synthetase Gens in Pflanzen zur Herstellung von Pflanzen, die tolerant gegenüber Inhibitoren der GMP-Synthetase sind.
- 10

- Durch Überexpression der für eine GMP-Synthetase kodierenden Gensequenz SEQ-ID NO: 1 in einer Pflanze wird eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der GMP-Synthetase erreicht. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.
- 15

- Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten GMP-Synthetase-Gens kann beispielsweise in vitro durch Sproßmeristemvermehrung oder durch einen Keimungstest ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des GMP-Synthetase-Gens und deren Auswirkung auf die Resistenz gegenüber Hemmstoffen der GMP-Synthetase an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.
- 20
- 25

- Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette, enthaltend die DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1, die durch zusätzliche Expression der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 tolerant gegenüber Inhibitoren der GMP-Synthetase geworden sind, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, sowie Leguminosen.
- 30
- 35

- Eine Veränderung des Nukleotidgehaltes in Pflanzen kann in verschiedenen Fällen von Nutzen sein. Säuglingsnahrungsprodukten auf pflanzlicher Basis werden beispielsweise Nukleotide zugesetzt, um eine der Muttermilch entsprechende Nährstoffzusammensetzung zu erreichen. Weiterhin wäre ein optimierter Nukleotidgehalt im Falle der enteralen Ernährung von Patienten sinnvoll. Ein reduzierter Purin-Nukleotidgehalt in ernährungsrelevanten Pflanzen ist für die diätetische Ernährung Gicht-kranker Patienten relevant. Nukleotide wirken ferner geschmacksbildend und geschmacks-
- 40
- 45

verstärkend, so daß sich ein veränderter Nukleotidgehalt auf geschmackliche Eigenschaften von Pflanzen auswirkt.

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind daher Pflanzen, die nach
5 Expression der DNA-Sequenz SEQ-ID NO: 1 oder SEQ-ID No: 3 in der Pflanze einen modifizierten Gehalt an Guanosinnukleotiden aufweisen.

Eine Pflanze mit modifiziertem Gehalt an Guanosinnukleotiden wird
10 beispielsweise durch Expression einer zusätzlichen DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder 3 in sense- oder antisense-Orientierung in der Pflanze hergestellt. Modifizierter Gehalt an Guanosinnukleotiden bedeutet, daß sowohl Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Guanosinnukleotiden bei sense-Orientierung als auch Pflanzen mit erniedrigtem Gehalt an Guanosinnukleotiden bei sense-Orientierung (Cosuppression) oder antisense-Orientierung hergestellt werden können.
15

Erhöhung des Gehaltes an Guanosinnukleotiden bedeutet beispielsweise im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung für Guanosinnukleotide durch funktionelle Überexpression des GMP-Synthetase-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.
20

25 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung pflanzlicher GMP-Synthetasen zur Veränderung der Konzentrationen von Methylxanthinen in Pflanzen.

30 Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, die Vakuole, das Mitochondrium, das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant
35 Sci. 15, 4 (1996), 285-423).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR eingebaut werden, siehe Beispiel 6.

40 Als Promotoren der erfindungsgemäßen Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der
45 einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21(1980), 285-294). Dieser Promotor enthält unterschiedliche

10

Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

5

Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen GMP-Synthetase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B.

- 10 der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant.Mol. Biol. (1993) 22, 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., Plant J. (1992) 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzier-
- 15 barer (EP0335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor sind in der Literatur beschrieben und können u.a. verwendet werden.

- Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die
- 20 Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Purinen bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kar-
- 25 toffel (Stockhaus et al., EMBO J., (1989) 8, 2445-245).

- Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors kann ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67% des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden
- 30 den (Fiedler und Conrad, Bio/Technology (1995) 10, 1090-1094). Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-Promotor, den USP- oder LEB4-Promotor), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten.

35

- Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine GMP-Synthetase kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden.
- 40 tid-Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-
- 45 Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Ver-

11

bindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beispielsweise beschrieben, die gewünschte Eigenschaft der Erhöhung des Gehaltes an Guanosinnukleotiden in der Pflanze durch Überexpression des GMP-Synthetase-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die GMP-Synthetase-Aktivität aufweisen oder durch *in vitro*-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzen genetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

Als weitere erfindungsgemäße geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein pflanzliches GMP-Synthetase-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf GMP-Synthetase-Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das GMP-Synthetase-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

Zweckmäßigerweise sollten die erfindungsgemäßen Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der erfindungsgemäße Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die erfindungsgemäße Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den erfindungsgemäßen Promotor, eine beliebige Sequenz und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

45

12

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

10

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine GMP-Synthetase kodierenden DNA wird eine erfindungsgemäße Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S.71-119 beschrieben.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, der biolistische Ansatz mit der Genkanone, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205-225 beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711).

45

13

Mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, 5 Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies sowie Leguminosen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

10

Der Biosyntheseort von Pyrimidinen ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des GMP-Synthetase-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Pyrimidin - Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze beispielsweise in 15 fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen GMP-Synthetase-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen. 20

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die erfindungsgemäßen Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in E. coli, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in E. coli als auch in Agrobakterien replizieren können. 25

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette zur Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des GMP-Synthetase Gehaltes in der Pflanze. 30

35

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung. 40

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

45

Beispiele

Gentechnische Verfahren, die den Ausführungsbeispielen zugrunde liegen:

5

Allgemeine Klonierungsverfahren

Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von Escherichia coli Zellen, Anzucht von Bakterien und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

15

Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase Kettenreaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.

25 Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, in p.a. Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) sowie Sigma (Deisenhofen) bezogen. Lösungen wurden mit aufbereitetem, pyrogenfreiem Wasser, im weiteren Text als H₂O bezeichnet, aus einer Milli-Q Water System Wasseraufbereitungsanlage (Millipore, Eschborn) angesetzt. Restriktionsendonucleasen, DNA-modifizierende Enzyme und molekularbiologische Kits wurden von den Firmen AGS (Heidelberg), Amersham (Braunschweig), Biometra (Göttingen), Roche (Mannheim), Genomed (Bad Oeynhausen), New England Biolabs (Schwalbach/Tausen), Novagen (Madison, Wisconsin, USA), Perkin-Elmer (Weierstadt), Pharmacia (Freiburg) Qiagen (Hilden) und Stratagene (Heidelberg) bezogen. Sie wurden, soweit nicht anders erwähnt, nach Herstellerangaben verwendet.

40 Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (E. coli, XL-1 Blue) wurden von Stratagene bezogen. E. coli AT 2465 wurde bei dem coli genetic stock centre (Yale University, New Haven) bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (Agrobacterium tumefaciens, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850kan) wurde von Deblaere et al. beschrieben (Nucl. Acids Res. 13 (1985) 4777). Alternativ können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere geeignete Stämme eingesetzt

15

werden. Zur Klonierung können die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33(1985), 103-119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZero (Invitrogen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12(1984) 8711-8720) und pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant 5 Science 66 (1990) 221-230) benutzt werden.

Beispiel 1

Isolierung einer cDNA des guaA Gens, codierend für eine GMP-
10 Synthetase aus Tabak.

Ein "expressed sequence tag" (EST) aus *Arabidopsis thaliana* (EST F14426), der auf einem partiellen Leseraster ein Polypeptid von 68 Aminosäuren mit 60 % Ähnlichkeit zu einer GMP-Synthetase aus
15 *Helicobacter pylori* codiert, wurde 5'-terminal ansequenziert. Von den 5'- und 3'-terminalen Sequenzen wurden die Oligonukleotide 5'-aag gat cca agc tct aag acc cta tcc-3' und 5'-tta gat ctt tat tcc cat tcg atg g-3' und für die Amplifikation durch Polymerase Kettenreaktion (PCR) eines 1000 bp cDNA-Fragments mit EST F14426
20 als Matrize in einem DNA-Thermal Cycler der Firma Perkin Elmer verwendet. Die Reaktionsgemische enthielten 0,1 ng/ μ l cDNA aus Tabak, 0,5 μ M der entsprechenden Oligonukleotide, 200 μ M Nukleotide (Pharmacia), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C, 1,5 mM MgCl₂) und 0.02 U/ μ l Taq Polymerase (Perkin Elmer).

25

Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

Anlagerungstemperatur:	52 °C, 1 min
Denaturierungstemperatur:	92 °C, 1 min
30 Elongationstemperatur:	72 °C, 1,5 min
Anzahl der Zyklen:	30

Das Fragment wurde zur Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek aus Kallusgewebe von *Nicotiana tabacum* (Varietät Samsun NN) im Vektor
35 ZAP Express eingesetzt. Dazu wurden $2,5 \times 10^5$ Lambda Phagen der cDNA-Bibliothek auf Agarplatten mit *E. coli* XL1-Blue als Bakterienstamm ausplattiert. Die Phagen-DNA wurde mittels Standardverfahren (Sambrook et al. (1989); Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) auf Nitrocellulosefilter (Gelman
40 Sciences) überführt und auf den Filtern fixiert. Als Hybridisierungssonde diente das oben beschriebene PCR-Fragment, das mit Hilfe eines "Multiprime DNA labelling systems" (Amersham Buchler) in Anwesenheit von α -³²P-dCTP (spezifische Aktivität 3000 Ci/mmol) nach Herstellerangaben radioaktiv markiert wurde. Die Hybridisierung der Membranen erfolgte nach Prähybridisierung bei 60 °C in 3
45 x SSPE, 0,1 % Natriumdodecylsulfat (w/v), 0,02 % Polyvinylpyrrolidon (w/v), 0,02 % Ficoll 400 (w/v) und 50 mg/ml Kalbsthymus DNA

16

für 12-16 Stunden (Sambrook et al. (1989); Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6). Anschließend wurden die Filter 60 Minuten in 2 x SSPE, 0,1 % Natriumdodecylsulfat (w/v) bei 60 °C gewaschen. Positiv hybridisierende Phagen wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht und durch Standardtechniken gereinigt und vereinzelt.

Es konnten 13 hybridisierende Signale identifiziert und gereinigt werden. Nach Restriktionsanalyse wurden die Klone GMP-6 und GMP-7M zur doppelsträngigen Sequenzierung ausgewählt. Die Auswertung der Sequenzdaten zeigte, daß der Klon GMP-7M mit einer Länge von 1973 bp einen vollständigen Leserahmen von 1614 bp enthielt, der für ein Protein von 538 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 60,1 KDa kodiert (SEQ-ID No. 1). Vor dem anzunehmenden Start-Codon findet sich im gleichen Leserahmen ein Stop-Codon, was den Schluß zuläßt, daß es sich mit GMP-7M um eine cDNA voller Länge handelt. GMP-7M stellt somit die erste pflanzliche Vollängen-cDNA einer GMP-Synthetase dar. GMP-6 stellt einen partiellen Klon dar, der 5'-seitig um 217 Nukleotide gegenüber GMP-7M verkürzt ist. GMP-7M weist Ähnlichkeiten zu GMP-Synthetasen aus Mikroorganismen und Tieren auf. Neben der auf EST F14426 codierten partiellen Aminosäuresequenz finden sich keine weiteren Sequenzen aus Pflanzen mit Homologie zu GMP-Synthetasen in den Datenbanken. Die größte Ähnlichkeit (62 %) besteht zu einer GMP-Synthetase aus *Helibacter pylori*. Es fällt zudem auf, daß die Ähnlichkeiten zwischen den C-Termini der GMP-Synthetasen größer sind als jene im Bereich der N-Termini. Der N-Terminus der GMP-7M Aminosäuresequenz korrespondiert mit den N-termini von GMP-Synthetasen aus anderen Organismen, wie *E. coli* und *Synechocystis* sp. (Tabelle 1). GMP-7M weist keine ausgeprägten Signalsequenzen auf (ermittelt durch Programm PSORT, Nakai, K., Institute for Molecular and Cellular Biology, Osaka University, Japan) was auf eine cytosolische Lokalisation des Proteins hinweisen könnte.

35 Tabelle 1

Sequenzgegenüberstellung von GMP-Synthetasen aus *Nicotiana tabacum* (guaA_N.t = GMP-7M), *Arabidopsis thaliana* (guaA_est_A.t, Genbank Nr. F14426), *E.coli* (guaA_e.c, Genbank Nr. 146276), *Synechocystis* sp. (guaA_syn, Genbank Nr. 1001583), *Helibacter pylori* (guaA_h.p, Genbank Nr. 3122166), *homo sapiens* (guaA_human, Genbank Nr. 1708072).

17

		1			50	
	guaA_N.t	-----MEPQ	TQAKKSNLVL	ILDYGSQYTH	LITRRIRSLs	
	guaA_est_A.t	-----	-----	-----	-----	
	guaA_e.c	-----m	tenihkhril	ildfgsqytq	lvarrvrelg	
	guaA_syn	mttqipvppv	vsdqalpdri	sdrllkgqiiv	ildfgsqyse	liarrirete
5	guaA_h.p	-----mil	vldfgsqytq	liarrlrerg		
	guaA_human	~malcngdsk	lenaggdlkd	ghhhyegavv	ildagaqygk	vidrrvrelf
		51			100	
	guaA_N.t	IFSLTINGTS	SLDSIKELDP	RVIILSGGPH	SVHADGAPCF	PPGFIEYVES
	guaA_est_A.t	-----	-----	-----	-----	-----
	guaA_e.c	vyselwawdv	teaqirdfnp	sgiiilsggpe	stteenspra	pq....yvfe
10	guaA_syn	vysevlsvrt	taqqlreikp	kgiilsggpn	svydggapec	dp....eifq
	guaA_h.p	iyteivpffe	sieniqkkap	kglilsggpa	svyakdaykp	sg....kifd
	guaA_human	vqseifplet	pafaikeggf	railisggpn	svyaedapwf	dpa....ift
		101			150	
	guaA_N.t	RGIHVLGICY	GLQLIVQKLG	GvvKIGEKHE	YGRMEIEVGK	NVV....GGL
15	guaA_est_A.t	-----	-----	-----	-----	-----
	guaA_e.c	agvpvfgvcy	gmqtamamlg	ghveasnere	fgyaqvevvn	dsalvrgied
	guaA_syn	lgvpvlvvcy	gmqlmvkqlg	grverakrge	ygkaslhidd	ptdlltnven
	guaA_h.p	lnvpilgicy	gmqylvdffg	gvvvganeqe	fgkavleitq	nsvifegv..
	guaA_human	igkpvlgicy	gmqmmnkfvf	gtvhkksvre	dgvfnisvsn	tcsflrglqk
		151			200	
20	guaA_N.t	FGNTEIGDKQ	VVWMSHGDEA	VKLPEGFEV	ARSSQGAVAA	IENRERRFYG
	guaA_est_A.t	-----	-----	-----	-----	-----
	guaA_e.c	altadgkpl1	dvwmshgdkv	taipsdfitv	astescpfai	maneekrfyg
	guaA_syn	dst.....	.mwmsbgdsc	vd1ptgfeil	ahtdntpcaa	iadhqkalfg
	guaA_h.pkiks	lvwmshmdkv	ielpkgfttl	akspnsphca	iengk..ifg
	guaA_humanee	vvllthgds	dkvadgfkvv	arsgni.vag	ianeskklyg
25		201			250	
	guaA_N.t	LQYHPEVTHS	TEGMRTLRFH	LFDVCGVTAG	WKMEDVLEEE	IKVIKGMVGP
	guaA_est_A.t	-----	-----	-----	-----	-----
	guaA_e.c	vqfhpevtht	rqqmrmlerf	vrldicqceal	wtpakiidda	varireqvg.
	guaA_syn	vqfhpevvhs	vggialirnf	vyhichcept	wttaafiees	irevrsqvg.
30	guaA_h.p	lqfhpevvqs	eeggkilenf	allvcgcekt	wgmqhfaqr	iarlkekia.
	guaA_human	aqfhpevglt	engkvilknf	lydiagcsqt	ftvqnrelec	ireikervgt
		251			300	
	guaA_N.t	EDHVICALSG	GVDSTVAAKL	VHKAIG.DRL	HCVFVDNGLL	RYKERERVME
	guaA_est_A.t	-----	-----	-----	-----	-----
	guaA_e.c	ddkvilglsg	gvdssvtaml	lhraig.knl	tcvfvdnll	rlneaeqvld
35	guaA_syn	drvvllalsg	gvdssstlaf1	lhraig.dnl	tcmfidqgfm	rkgeperlve
	guaA_h.p	nakvlcavsg	gvdstvvtat1	lhraig.dnl	iavfvdhgll	rknekervqa
	guaA_human	s.kvlvllsg	gvdstvctal	lnralnqeqv	iavhidngfm	rkresqsvee
		301			350	
	guaA_N.t	LF EK.....RLHLPVT	CVDATEEFLS	KLKGVTEPEM
	guaA_est_A.t	-----	-----	-----	-----	-----
40	guaA_e.c	mfgd.....hfglniv	hvpadrfls	alagendpea
	guaA_syn	lf dh.....qfhipvq	yvnardrflk	qlegvtdpee
	guaA_h.p	mfd.....lkipln	tidakevfls	klkgvsepel
	guaA_human	alkklgiqv	vinaahsfyn	gtttlpisde	drtprkrisk	tlnmttspee
		351			400	
45	guaA_N.t	KRKIIIGKEFI	NIFDLFAHDV	EEKVGKKPSY	LVQGTLYPDV	IESC...PPP
	guaA_est_A.t	-----	-----	-----	-----	-----
	guaA_e.c	krkiigrvfv	evfd..eeal	k...ledvkw	laqgtiypdv	iesaa....
	guaA_syn	krllighefi	qvfe..eesn	r...lpgfdy	laqgtiypdv	iesadsnvd

18

	guaA_h.p	krkiigetfi	evfe..keak	khhkkgkief	laqgtlypdv	iesvsv....
	guaA_human	krkiigdtfv	ki..anevig	emnlkpeevf	laqgtlrpd	iesasl....
		401				450
	guaA_N.t	GSGRTHSHTI	KSHHNVGGLP	KDMKL..KLI	EPLKLLFKDE	VRELGKILDI
5	guaA_est_A.t	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_e.c	atgk..ahvi	kshhnvggpl	kemkm..glv	eplkelfkde	vrkiglelgl
	guaA_syn	ktgervavki	kshhnvggpl	knlrf..klv	eplrklfkde	vrklgrsigl
	guaA_h.p	...kgpskvi	kthhnvggpl	ewmdf..kli	eplrelfkde	vrllgkelgv
	guaA_human	.vasgkaeli	kthhndteli	rkltreegkvi	eplkdfhkde	vrilgrelgl
		451				500
10	guaA_N.t	SEDFLKRHPF	PGPGLAVRIP	GDVTAGNSLD	ILRQVDEIFI	QSIRDAKIYD
	guaA_est_A.t	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_e.c	pydmlyrhpf	pgpglgvrvi	gevkk.eycd	llrradaifi	eelrkadlyd
	guaA_syn	peeivrrhpf	pgpglairii	gevts.erln	ilrdadfivr	deiskrgiyh
	guaA_h.p	sqdflmrhpf	pgpglavril	geise.skik	rlqeadfifi	eelkkanlyd
	guaA_human	peelvsrhpf	pgpglairvi	c.aeepyick	dfpetnnilk	ivadfsasvk
15		501				550
	guaA_N.t	EIWQAFVFL	PVKTVGVQGD	QRTSHAVAL	RA.VTSQDGM	TADWYFDFK
	guaA_est_A.t	~~~~~	~~~~~aagd	kgtiphvgcp	pcrlqaqvg	tadwfifehk
	guaA_e.c	kvsqaftvfl	pvrsvgvmgd	grkydwvvs	ra.vetidfm	tahwahlpyd
	guaA_syn	dywqafavll	pirsvgvmgd	krtyahpvvl	rf.itsedgm	tadwarvpyd
	guaA_h.p	kvwqafcvll	nvnsvgvmgd	nrtynaicl	ra.vnasdgm	tasfsflehs
20	guaA_human	kphltllqrvk	actteedqek	lmqitslshl	nafllpiktv	gvqgdcrsys
		551				600
	guaA_N.t	FLDDVSRKIC	NSVRGVNRVL	LDITSKPPST	IEWE~~~~~	~~~~~
	guaA_est_A.t	flddvsrkic	nsvqgvnrvv	lditskppst	iewe~~~~~	~~~~~
	guaA_e.c	flgrvsnrri	nevngisrvv	ydisgkppat	iewe~~~~~	~~~~~
25	guaA_syn	ileaishnriv	nevkgvnrvv	yditskppgt	iewe~~~~~	~~~~~
	guaA_h.p	flekvsnrri	nevsginrvv	yditskppgt	iewe~~~~~	~~~~~
	guaA_human	yvcgisskde	pdweslifla	rliprmchnv	nrvvyifgpp	vkepptdvt
		601				650
	guaA_N.t	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
30	guaA_est_A.t	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_e.c	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_syn	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_h.p	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_human	tflttgvlst	lrqadfeahn	ilresgyagk	isqmpvilt	lhfdrdplqk
		651				700
35	guaA_N.t	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_est_A.t	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_e.c	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_syn	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_h.p	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	guaA_human	qpscqrsvvi	rtfitsdfmt	gipatpgnei	pvevvlkmvt	eikkipgisr
40		701	716			
	guaA_N.t	~~~~~	~~~~~			
	guaA_est_A.t	~~~~~	~~~~~			
	guaA_e.c	~~~~~	~~~~~			
	guaA_syn	~~~~~	~~~~~			
	guaA_h.p	~~~~~	~~~~~			
45	guaA_human	imydltskpp	gttewe			

19

Beispiel 2

Isolierung einer cDNA des *guaA* Gens, codierend für eine GMP-Synthetase aus dem Moos *Physcomitrella patens*

5

Aus mRNA verschieden alter Protonemata von *Physcomitrella patens* wurde doppelsträngige cDNA erzeugt und zur Herstellung einer cDNA-Bank im Vektor pBluescript SKII verwendet (lambda ZAP II RI Library construction Kit, Stratagene). Einzelne Klone dieser Bank

- 10 wurden ansequenziert. Die Sequenz des Klons 093-d11 wies deutliche Homologie zur GMP-Synthetase aus *Aquifex aeolicus* auf. Die vollständige Sequenz von 093-d11 wurde bestimmt, siehe SEQ-ID No. 3. 093_d11 weist eine Länge von 1232 Nukleotiden auf und codiert auf einem durchgehenden Leseraster für 382 Aminosäuren. Aus dem
- 15 Vergleich mit GMP-7M geht hervor, daß es sich bei 093_d11 um eine partielle cDNA handelt. Die Homologie zu GMP-7M beträgt 66,7 % auf Nucleotidebene bzw. 74,6 % auf Aminosäureebene.

Beispiel 3

20

Funktionsnachweis für GMP-7M durch Komplementation von *E. coli*

Die GMP-7M cDNA wurde als Matrize für eine PCR mit den Oligonucleotiden 5'-CCTAGCCATGGAACCTCAAAC-3' und 5'-TATAGGATCCTACTTTG-

- 25 GTCACC-3' eingesetzt. Die Reaktionsgemische enthielten ca. 0,1 ng GMP-7M DNA, 0,5 µM der entsprechenden Oligonukleotide, 200 µM Nukleotide (Pharmacia), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25 °C, 1,5 mM MgCl₂) und 0.02 U/µl Pfu-Polymerase (Stratagene).

- 30 Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

Anlagerungstemperatur:	50 °C, 30 sec
Denaturierungstemperatur:	92 °C, 30 sec
Elongationstemperatur:	72 °C, 3 min

- 35 Anzahl der Zyklen: 25

Das erhaltene Fragment von ca. 1670 bp wurde über die durch die Oligonukleotide eingefügten NcoI- und BamHI-Schnittstellen in den Vektor pTrc99A (Pharmacia) ligiert. Das erhaltene Konstrukt

- 40 GMP-7Trc wurde in den *E. coli* Stamm AT2465 (genetische Marker: *thi*-1, *guaA*21, *relA*1, λ, *spoT*1) transformiert und auf M9-Minimalmedien (Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) mit und ohne 100 µg/ml Guanosin plattiert. Die Minimalmedien enthielten 0,4 % Glucose, 0,2% Casami-
- 45 noacids, 100 µg/ml Thiamin, 100 µg/ml Inosin, 100 µg/ml Biotin, 100 µg/ml Histidin, 100 µg/ml Arginin, 100 µg/ml 2'-Deoxyuridin, 100 µM IPTG und 25 µg/ml Ampicillin. Im Parallelexperiment wurde

20

der Klonierungsvector pTrc99A in AT2465 transformiert. Es zeigte sich, daß nur die transformierten Bakterien zu einem Wachstum auf Minimalmedien ohne Guanosin fähig waren, die eine GMP-7M cDNA aus Tabak im Expressionsvektor pTrc 99 enthielten (siehe Tab. 2), was 5 stark darauf hinweist, daß die GMP-7M cDNA für eine aktive GMP-Synthetase codiert. Das durch GMP-7M codierte Enzym stellt damit die erste aus Pflanzen isolierte funktionelle GMP-Synthetase dar.

Tabelle 2

10

Wachstum von E. coli AT2465 transformiert mit verschiedenen Plasmiden nach 2 Tagen bei 37°C

15

	pTrc 99A + GMP-7M	pTrc99A
Minimalmedium ohne Guanosin	+	-
Minimalmedium mit Guanosin (100 µg/ml)	+	+

20

Beispiel 4

Überexpression der GMP-Synthetase aus Tabak in E.coli und Erzeugung von Antikörpern

25

Zur Überexpression in E.coli wurden durch (PCR) mit GMP-7M als Matrize und den Oligonukleotiden GMPA: 5'-GCAATGGATCCTCAAACA-CAGGCG-3' und GMPB: 5'-AAAAGGATCCTACTTTGGTCACC-3' BamHI-Schnittstellen eingeführt, über welche das Fragment in den Vector pET15b 30 (Novagen) kloniert werden konnte. Auf diese Weise wurde ein GMP-7M-Leseraster mit Hexahistidin-Anker am N-Terminus erzeugt. Nach Kontrolle der korrekten Orientierung durch Restriktionsverdau und Ausschluß von Polymerasefehlern durch Sequenzierung, wurde das erhaltene Konstrukt GMP-7E in E. coli BL21(DE3) (Stratagene) 35 transformiert. IPTG-induzierte Tageskulturen wurden durch Zentrifugation geerntet und die Zellpellets nach Herstellerangaben zur Nickel-Affinitätschromatographie aufgeschlossen und weiterbehandelt ("Qia-Express-Kit", Qiagen). Auf diese Weise konnte die GMP-Synthetase auf mehr als 95 % Reinheit aufgereinigt 40 werden. Das Protein wurde nach üblichen Protokollen zur Erzeugung von Antiseren in Kaninchen verwendet (im Auftrag durchgeführt durch die Firma Eurogentec, Herstal, Belgien).

45

21

Beispiel 5

Expression der GMP-Synthetase aus Tabak in Baculovirus-infizierten Insektenzellen

5

Um genügend aktive GMP-Synthetase für die Massentestung von Chemikalien zu erhalten, wurde aus GMP-7E mit BamHI ein 1,65 kb Fragment excisiert und in den Transfervektor pFastBacHTa (GibcoBRL) kloniert. Das erhaltene Konstrukt GMP-7I wurde nach

- 10 Herstellerangaben (GibcoBRL) zur Erzeugung von rekombinantem Baculovirus verwendet. Dieses Virus wurde nach Herstellerangaben (GibcoBRL) zur Infektion von Sf21 Insektenzellen genutzt, um aktive GMP-Synthetase zu erzeugen, deren Aktivität nach Aufschluß der Zellen in 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM
- 15 PMSF und Entsalzung des Extraktes über eine Sephadex G-25-Säule (Pharmacia, Schweden) gemessen werden konnte.

Beispiel 6

20 Erzeugung pflanzlicher Expressionskassetten

Mit dem Ziel die GMP-Synthetase-Aktivität in transgenen Tabakpflanzen zu reduzieren, wurde die Antisense- und die Cosuppressionstechnik angewendet. Dazu wurden Plasmid-Konstrukte im Vektor

25 pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science (1990) 66, 221-230) erzeugt. Ein mit BamHI und BglII aus GMP-7M erhaltenes Fragment von 1599 bp wurde in den mit BamHI geschnittenen Vector pBinAR ligiert. Das 1599 bp Fragment codiert den 5'-terminalen Teil der GMP-Synthetase cDNA. Nach Transformation in E.coli XL1-blue

- 30 erhaltene Klone wurden durch Kontrollschnitt mit HindIII auf die Orientierung der 1599-Kassette untersucht. Auf diese Weise wurden die Plasmide pGMP7AS (antisense-Konstrukt) und pGMP7EX (sense-Konstrukt) identifiziert, siehe Abbildung 2.

35 Beispiel 7

Erzeugung und Analyse transgener Pflanzen

Die Plasmide pGMP7AS und pGMP7EX - siehe Abbildung 2 - wurden in

40 Agrobacterium tumefaciens C58C1:pGV2260 transformiert (Deblaere et al., Nucl. Acids. Res. 13(1984), 4777-4788). Zur Transformation von Tabakpflanzen (Nicotiana tabacum cv. Samsun NN) wurde eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtskultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie in Murashige-Skoog Medium (Phy-

- 45 siol. Plant. 15(1962), 473) mit 2 % Saccharose (2MS-Medium) benutzt. Blattscheiben steriler Pflanzen (zu je ca. 1 cm²) wurden in einer Petrischale mit einer 1:50 Agrobakterienverdünnung für 5-10

22

Minuten inkubiert. Es folgte eine 2-tägige Inkubation in Dunkelheit bei 25 °C auf 2MS-Medium mit 0,8 % Bacto-Agar. Die Kultivierung wurde nach 2 Tagen mit 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit weitergeführt und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500 mg/1 Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/1 Kanamycin, 1 mg/1 Benzylaminopurin (BAP), 0,2 mg/1 Naphtylelessigsäure und 1,6 g/1 Glukose weitergeführt. Wachsende Sprosse wurden auf MS-Medium mit 2 % Saccharose, 250 mg/1 Claforan und 0,8 % Bacto-Agar überführt. Regenerierte Sprosse werden auf 2MS-Medium mit Kanamycin und Claforan erhalten, nach Bewurzelung in Erde überführt und nach Kultivierung für zwei Wochen in einer Klimakammer im 16 Stunden hell/8 Stunden dunkel-Rhythmus bei 60 % Luftfeuchte auf Fremdgenexpression bzw. veränderte Metabolitgehalte und phänotypische Wachstumsmerkmale untersucht. Veränderte Nukleotidegehalte können z.B. nach der Methode von Stitt et al. (FEBS Letters, 145 (1982), 217-222) bestimmt werden.

Die transgenen Linien sowie die Nachkommen der 1. und 2. Generation wiesen ein verringertes Wachstum in Erde auf. In Pflanzen mit verringertem Wachstum konnte eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte GMP-7M RNA-Menge in der Northern-Hybridisierung detektiert werden. Dazu wurden je 40µg Gesamt-RNA aus Sink-Blättern eingesetzt. Gesamt-RNA aus pflanzlichen Geweben wurde wie bei Logemann et al. (Anal. Biochem. 163 (1987), 21) isoliert. Für die Analyse wurden jeweils 40 µg RNA in einem Formaldehydhaltigen 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt und auf Nylon Membranen (Hybond, Amersham) überführt. Der Nachweis spezifischer Transkripte wurde wie bei Amasino beschrieben durchgeführt (Anal. Biochem. 152(1986), 304). Die als Sonde eingesetzten cDNA-Fragmente wurden mit einem Random Primed DNA Labeling Kit (Roche, Mannheim) radioaktiv markiert und nach Standardmethoden hybridisiert, siehe Hybond-Benutzerhinweise, Amersham. Hybridisierungssignale wurden durch Autoradiographie mithilfe von X-OMAT AR Filmen der Fa. Kodak sichtbar gemacht.

Ferner konnte im Western-blot Experiment eine im Vergleich mit Wildtyppflanzen verringerte Menge der GMP-Synthetase in den transgenen Linien detektiert werden. Dazu wurden Gesamtproteinextrakte aus Sink-Blättern hergestellt, nach Standardmethoden in den SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese separiert und auf Nitrocellulose-Membranen transferiert. Die Detektion erfolgte mit einem IgG-alkalische Phosphatase-Konjugat und dem BCIP/NBT-System (Sigma).

23

Desweiteren konnte durch den in Beispiel 8 beschriebenen in vitro Assay eine verringerte GMP-Synthetase-Aktivität in transgenen Linien mit verringertem Wachstum festgestellt werden.

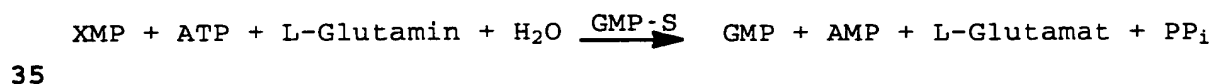
- 5 Der korrelative Zusammenhang zwischen Expressionsniveau sowie der Aktivität der GMP-Synthetase und dem Wachstumsphänotyp läßt auf die Eignung der GMP-Synthetase als Target für Herbizide schließen.
- 10 Veränderung der Nukleotidgehalte Veränderung des Methylxanthin-Gehalts

Beispiel 8

15 Testsysteme zur Messung der GMP-Synthetase-Aktivität

- Zur Messung der pflanzlichen GMP-Synthetase-Aktivität können die nach Spector (Methods in Enzymology LI, 1978, 219-224) für tierische Enzyme entwickelten Systeme verwendet werden. Im ersten System wird die AMP-Bildung durch Kopplung der Reaktion mit AMP-Kinase, Pyruvat Kinase, Lactat-Dehydrogenase und Messung bei 340 nm ermöglicht. Das zweite System basiert auf dem direkten Nachweis des GMP (Guanosinmonophosphat) durch Einsatz des radioaktiv markierten Substrats XMP (Xanthinmonophosphat) und Auftrennung in der Dünnschichtchromatographie.

- Alternativ kann die GMP-Synthetase-Aktivität auch über ein neues System, nämlich den gekoppelten Nachweis des entstehenden Glutamats gemessen werden. Dieses System bietet den Vorteil einer geringeren Anzahl gekoppelter Reaktionsschritte und liefert größere Signalstärken.



- (GMP-S = GMP-Synthetase, GluDH = Glutamat-Dehydrogenase, APAD = 40 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid)

- Dazu wurde der Reaktionsansatz (s.u.) für 60 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch 5-minütige Inkubation bei 95°C gestoppt. Der Nachweis des gebildeten Glutamats erfolgte im Nachweisansatz (s.u.) durch photometrische Messung der APADH-Zunahme bei 363 nm.

24

Reaktionsansatz:

100 µL	750 mM	Tris/HCl-Puffer pH 7,8
100 µL	100 mM	MgCl ₂
5	100 µL 80 mM	KCl
	100 µL 20 mM	XMP
	100 µL 200 mM	L-Glutamin
	400 µL	H ₂ O
	<u>100 µL</u>	Proteinextrakt
10	1000 µL	

Nachweisansatz:

375 µL	100 mM	Tris-HCl-Ruffer pH 8.0
15	75 µL 500 mM	KCl
	125 µL	H ₂ O
	75 µL 3 mM	APAD
	<u>100 µL</u>	des Reaktionsansatzes
	750 µL	

20

Beispiel 9

Suche nach Inhibitoren der GMP-Synthetase Aktivität

- 25 Zur Suche nach Inhibitoren der GMP-Synthetase Aktivität kann der in Beispiel 8 beschriebene *in vitro* Assay mit Hochdurchsatzmethoden verwendet werden. Die GMP-Synthetase Aktivität kann dazu aus Pflanzengewebe präpariert werden. Bevorzugt kann eine pflanzliche GMP-Synthetase in *E.coli*, Insektenzellen oder einem anderen
- 30 geeigneten Expressionssystem exprimiert und anschließend angereichert oder isoliert werden. Auf diese Weise konnten bekannte Inhibitoren, wie 6-thio-XMP identifiziert werden.

35

40

45

Abbildung 1

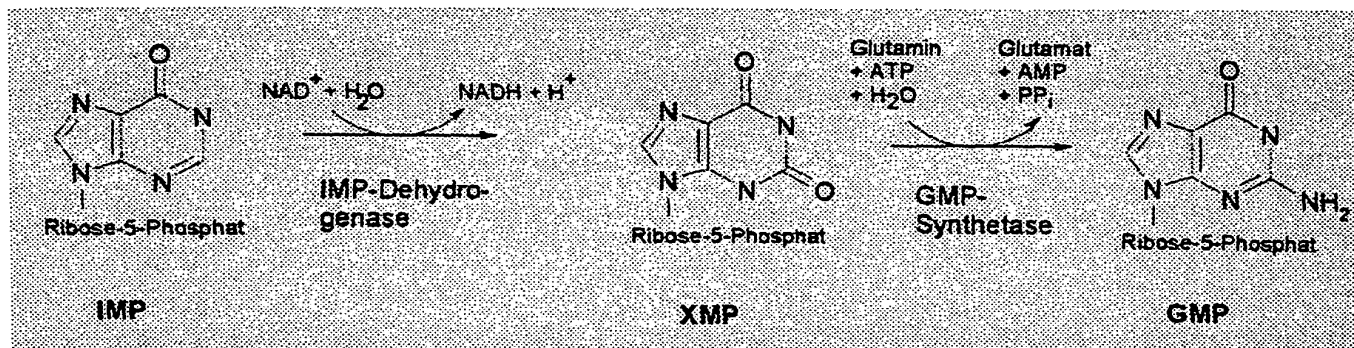
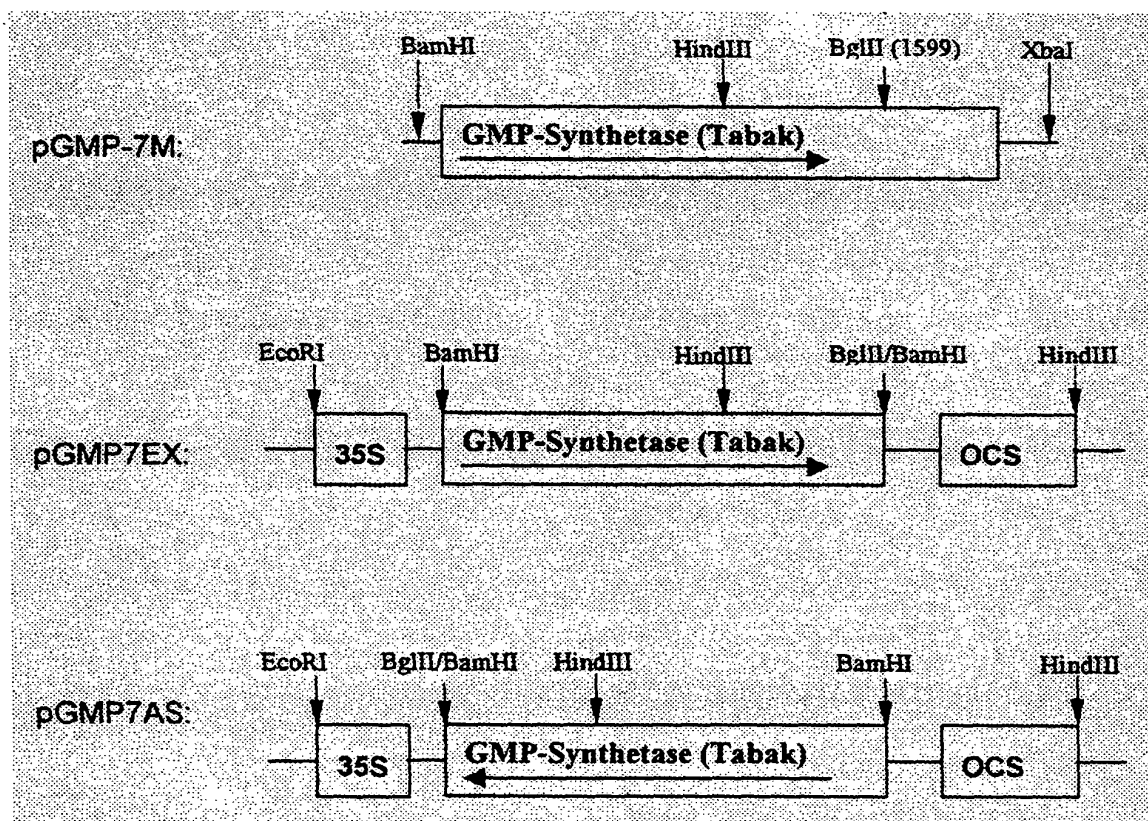


Abbildung 2



GMP-Synthetase

Zusammenfassung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft eine DNA codierend für ein Polypeptid mit GMP-Synthetase (EC 6.3.5.2) Aktivität. Zudem betrifft die Erfindung die Verwendung dieser Nukleinsäure zur Herstellung eines Testsystems.

10

15

20

25

30

35

40

45

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> GMP-Synthetase aus Pflanzen

<130> NAE 1122-99

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1973

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> CDS

<222> (65)..(1678)

<400> 1

gaattcggca cgagatttct ctctatcttt ctctctccca cccaccaccc accctccct 60

agca atg gaa cct caa aca cag gcg aag aaa tca aac ctc gta cta atc 109

Met Glu Pro Gln Thr Gln Ala Lys Lys Ser Asn Leu Val Leu Ile

1 5 10 15

cta gac tac ggt tct cag tac act cac cta atc acc cgc cga atc cga 157

Leu Asp Tyr Gly Ser Gln Tyr Thr His Leu Ile Thr Arg Arg Ile Arg

20 25 30

agc cta tca att ttc tca ctc acc att aac ggc acc tct tcg tta gac 205

Ser Leu Ser Ile Phe Ser Leu Thr Ile Asn Gly Thr Ser Ser Leu Asp

35 40 45

tcc ata aaa gaa ctc gac cca cgt gtc att atc ctc tcg ggt gga ccc 253

Ser Ile Lys Glu Leu Asp Pro Arg Val Ile Ile Leu Ser Gly Gly Pro

50 55 60

cac agc gtc cac gct gac ggc gca ccg tgt ttc cca cct ggg ttc atc 301

His Ser Val His Ala Asp Gly Ala Pro Cys Phe Pro Pro Gly Phe Ile

65 70 75

gaa tac gtc gag tca cgt ggg att cac gtg ttg ggt ata tgt tat ggg 349

2

Lys Glu Arg Glu Arg Val Met Glu Leu Phe Glu Lys Arg Leu His Leu	
275	280 285
cct gtt acc tgt gtc gat gct aca gaa gaa ttt ctc agc aaa cta aaa	973
Pro Val Thr Cys Val Asp Ala Thr Glu Glu Phe Leu Ser Lys Leu Lys	
290	295 300
ggc gta aca gaa cct gaa atg aag agg aaa ata att ggg aag gag ttc	1021
Gly Val Thr Glu Pro Glu Met Lys Arg Lys Ile Ile Gly Lys Glu Phe	
305	310 315
atc aac ata ttt gat ctt ttt gcc cat gat gtg gag gaa aaa gta ggg	1069
Ile Asn Ile Phe Asp Leu Phe Ala His Asp Val Glu Glu Lys Val Gly	
320	325 330 335
aaa aaa cct agt tac cta gtc caa gga acc ttg tat cct gat gta ata	1117
Lys Lys Pro Ser Tyr Leu Val Gln Gly Thr Leu Tyr Pro Asp Val Ile	
340	345 350
gag tct tgt cct cca cct gga agt gga aga aca cat tct cat aca atc	1165
Glu Ser Cys Pro Pro Pro Gly Ser Gly Arg Thr His Ser His Thr Ile	
355	360 365
aag agc cat cat aat gtt gga ggt ctt cca aag gac atg aag ctg aag	1213
Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Lys Asp Met Lys Leu Lys	
370	375 380
ctc atc gag cca ctg aaa ctt cta ttc aag gat gag gtt cgt gaa ttg	1261
Leu Ile Glu Pro Leu Lys Leu Leu Phe Lys Asp Glu Val Arg Glu Leu	
385	390 395
gga aag att ttg gat ata tct gag gac ttt ctt aaa cgc cac ccg ttc	1309
Gly Lys Ile Leu Asp Ile Ser Glu Asp Phe Leu Lys Arg His Pro Phe	
400	405 410 415
cct ggg ccc gga ctc gct gtg cga att cca ggt gat gtc aca gca ggg	1357
Pro Gly Pro Gly Leu Ala Val Arg Ile Pro Gly Asp Val Thr Ala Gly	
420	425 430
aat tcc ttg gat att ctt cgt cag gtt gat gaa atc ttc att caa tca	1405
Asn Ser Leu Asp Ile Leu Arg Gln Val Asp Glu Ile Phe Ile Gln Ser	
435	440 445
atc aga gat gct aaa atc tat gat gaa ata tgg caa gct ttt gct gtc	1453
Ile Arg Asp Ala Lys Ile Tyr Asp Glu Ile Trp Gln Ala Phe Ala Val	
450	455 460
ttc tta cca gtg aaa act gtt gga gta caa gga gac caa aga acc cat	1501

Phe Leu Pro Val Lys Thr Val Gly Val Gln Gly Asp Gln Arg Thr His
 465 470 475
 tcc cac gct gtt gca ctt aga gca gtc aca agt caa gat gga atg act 1549
 Ser His Ala Val Ala Leu Arg Ala Val Thr Ser Gln Asp Gly Met Thr
 480 485 490 495
 gca gac tgg tac tac ttt gat ttc aag ttc ctt gac gac gta tca aga 1597
 Ala Asp Trp Tyr Tyr Phe Asp Phe Lys Phe Leu Asp Asp Val Ser Arg
 500 505 510
 aag atc tgc aat agt gtt cgt ggt gta aat cga gtt ctg ctg gat att 1645
 Lys Ile Cys Asn Ser Val Arg Gly Val Asn Arg Val Leu Leu Asp Ile
 515 520 525
 aca tca aag cct cca tca aca atc gaa tgg gaa taatttgta taaagaatgc 1698
 Thr Ser Lys Pro Pro Ser Thr Ile Glu Trp Glu
 530 535
 tatatttggg gaccaaagta ggattctttt gtgatttttg gtgcataaca aaaaggaaga 1758
 aaatcataat agaaatttag gtccttttgg tatgtggttag aactgggttct tgggtaatta 1818
 tgtgcaatgc tctcaacaat tttgtatggt tatgggtatg atgataccaa attttactca 1878
 gatcttggta gtacattttt cttatccaag tatagtaaca tgtggccagg catcaaaagc 1938
 ctattccact caaaaaaaaaa aaaaaaaaaac tcgag 1973

<210> 2
 <211> 538
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum

<400> 2
 Met Glu Pro Gln Thr Gln Ala Lys Lys Ser Asn Leu Val Leu Ile Leu
 1 5 10 15
 Asp Tyr Gly Ser Gln Tyr Thr His Leu Ile Thr Arg Arg Ile Arg Ser
 20 25 30
 Leu Ser Ile Phe Ser Leu Thr Ile Asn Gly Thr Ser Ser Leu Asp Ser
 35 40 45
 Ile Lys Glu Leu Asp Pro Arg Val Ile Ile Leu Ser Gly Gly Pro His
 50 55 60

Ser Val His Ala Asp Gly Ala Pro Cys Phe Pro Pro Gly Phe Ile Glu
65 70 75 80

Tyr Val Glu Ser Arg Gly Ile His Val Leu Gly Ile Cys Tyr Gly Leu
85 90 95

Gln Leu Ile Val Gln Lys Leu Gly Gly Val Val Lys Ile Gly Glu Lys
100 105 110

His Glu Tyr Gly Arg Met Glu Ile Glu Val Gly Lys Asn Val Val Gly
115 120 125

Gly Leu Phe Gly Asn Thr Glu Ile Gly Asp Lys Gln Val Val Trp Met
130 135 140

Ser His Gly Asp Glu Ala Val Lys Leu Pro Glu Gly Phe Glu Val Val
145 150 155 160

Ala Arg Ser Ser Gln Gly Ala Val Ala Ala Ile Glu Asn Arg Glu Arg
165 170 175

Arg Phe Tyr Gly Leu Gln Tyr His Pro Glu Val Thr His Ser Thr Glu
180 185 190

Gly Met Arg Thr Leu Arg His Phe Leu Phe Asp Val Cys Gly Val Thr
195 200 205

Ala Gly Trp Lys Met Glu Asp Val Leu Glu Glu Glu Ile Lys Val Ile
210 215 220

Lys Gly Met Val Gly Pro Glu Asp His Val Ile Cys Ala Leu Ser Gly
225 230 235 240

Gly Val Asp Ser Thr Val Ala Ala Lys Leu Val His Lys Ala Ile Gly
245 250 255

Asp Arg Leu His Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu Leu Arg Tyr Lys
260 265 270

Glu Arg Glu Arg Val Met Glu Leu Phe Glu Lys Arg Leu His Leu Pro
275 280 285

Val Thr Cys Val Asp Ala Thr Glu Glu Phe Leu Ser Lys Leu Lys Gly
290 295 300

Val Thr Glu Pro Glu Met Lys Arg Lys Ile Ile Gly Lys Glu Phe Ile
305 310 315 320

Asn Ile Phe Asp Leu Phe Ala His Asp Val Glu Glu Lys Val Gly Lys
325 330 335

Lys Pro Ser Tyr Leu Val Gln Gly Thr Leu Tyr Pro Asp Val Ile Glu
340 345 350

Ser Cys Pro Pro Pro Gly Ser Gly Arg Thr His Ser His Thr Ile Lys
355 360 365

Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Lys Asp Met Lys Leu Lys Leu
370 375 380

Ile Glu Pro Leu Lys Leu Leu Phe Lys Asp Glu Val Arg Glu Leu Gly
385 390 395 400

Lys Ile Leu Asp Ile Ser Glu Asp Phe Leu Lys Arg His Pro Phe Pro
405 410 415

Gly Pro Gly Leu Ala Val Arg Ile Pro Gly Asp Val Thr Ala Gly Asn
420 425 430

Ser Leu Asp Ile Leu Arg Gln Val Asp Glu Ile Phe Ile Gln Ser Ile
435 440 445

Arg Asp Ala Lys Ile Tyr Asp Glu Ile Trp Gln Ala Phe Ala Val Phe
450 455 460

Leu Pro Val Lys Thr Val Gly Val Gln Gly Asp Gln Arg Thr His Ser
465 470 475 480

His Ala Val Ala Leu Arg Ala Val Thr Ser Gln Asp Gly Met Thr Ala
485 490 495

Asp Trp Tyr Tyr Phe Asp Phe Lys Phe Leu Asp Asp Val Ser Arg Lys
500 505 510

Ile Cys Asn Ser Val Arg Gly Val Asn Arg Val Leu Leu Asp Ile Thr
515 520 525

Ser Lys Pro Pro Ser Thr Ile Glu Trp Glu
530 535

<210> 3

<211> 1232

<212> DNA

<213> Physcomitrella patens

<220>

<221> CDS

<222> (3)..(1148)

<400> 3

ga att cgg cac gag gcc act agt acg cag ggt aat att gcc gct att	47
Ile Arg His Glu Ala Thr Ser Thr Gln Gly Asn Ile Ala Ala Ile	
1 5 10 15	
 gaa aat gtg gat tcc aga atc tac gcc ctc caa tac cat ccc gag gtt	95
Glu Asn Val Asp Ser Arg Ile Tyr Ala Leu Gln Tyr His Pro Glu Val	
20 25 30	
 acg cac tca gag aaa ggg aca gag act ttg aga cac ttt ttc ctg aat	143
Thr His Ser Glu Lys Gly Thr Glu Thr Leu Arg His Phe Phe Leu Asn	
35 40 45	
 gtc tgc ggc atg aag gct gac tgg cag atg cag aat gtg ttg gag gaa	191
Val Cys Gly Met Lys Ala Asp Trp Gln Met Gln Asn Val Leu Glu Glu	
50 55 60	
 gag att aaa aag gtc act gcg acc gtc ggc cca gat gat cat gtt att	239
Glu Ile Lys Lys Val Thr Ala Thr Val Gly Pro Asp Asp His Val Ile	
65 70 75	
 tgt gca ctc tcc ggg ggc gtg gac tca aca gta gca gct act ctg gtg	287
Cys Ala Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser Thr Val Ala Ala Thr Leu Val	
80 85 90 95	
 cac cgt gct att gga gat cgc ctt cat tgt gtg ttt gta gat aat ggc	335
His Arg Ala Ile Gly Asp Arg Leu His Cys Val Phe Val Asp Asn Gly	
100 105 110	
 ctt tgc aga tac aag gaa aga gaa aga gtg atg gcc aca ttt gtg aaa	383
Leu Cys Arg Tyr Lys Glu Arg Glu Arg Val Met Ala Thr Phe Val Lys	
115 120 125	
 gac ctt cat ctg cca gtc act tgt gtg gat gcc act gag cag ttt ctc	431
Asp Leu His Leu Pro Val Thr Cys Val Asp Ala Thr Glu Gln Phe Leu	
130 135 140	
 agc aaa ttg aag ggc gtg gta gat cca gag aga aag agg aag atc atc	479
Ser Lys Leu Lys Gly Val Val Asp Pro Glu Arg Lys Arg Lys Ile Ile	
145 150 155	
 gga gca gag ttt att gca gtc ttt gat gaa ttt tcg cac aga ttg gag	527
Gly Ala Glu Phe Ile Ala Val Phe Asp Glu Phe Ser His Arg Leu Glu	
160 165 170 175	

aga gag att gga aag atg cct gct ttc ctt gtg cag gga aca ctt tat	575
Arg Glu Ile Gly Lys Met Pro Ala Phe Leu Val Gln Gly Thr Leu Tyr	
180 185 190	
cca gat gtc att gag tcg tgt cct cct cca ggg agc ggg aag tcg cat	623
Pro Asp Val Ile Glu Ser Cys Pro Pro Gly Ser Gly Lys Ser His	
195 200 205	
tcc cac aca atc aaa agt cat cac aac gtc ggt ggc ttg ccc gag aac	671
Ser His Thr Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Glu Asn	
210 215 220	
atg aaa ttg aag ttg gtt gag cct ctc aag tgg ctc ttc aaa gac gag	719
Met Lys Leu Lys Leu Val Glu Pro Leu Lys Trp Leu Phe Lys Asp Glu	
225 230 235	
gta cgc gaa atg ggt gca ttg ttg gat gta cct gtt tcc ttt ttg aag	767
Val Arg Glu Met Gly Ala Leu Leu Asp Val Pro Val Ser Phe Leu Lys	
240 245 250 255	
cgc cat cct ttc cct gga cct gga ttg gcc gtg cga att ctt ggg gat	815
Arg His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Ala Val Arg Ile Leu Gly Asp	
260 265 270	
gta act cag gac ggc gca ctc gac act atc cgc ttg gtt gat gag atc	863
Val Thr Gln Asp Gly Ala Leu Asp Thr Ile Arg Leu Val Asp Glu Ile	
275 280 285	
ttt gtg aac agc att cga gag gca ggt ctt tac gat aag atc tgg cag	911
Phe Val Asn Ser Ile Arg Glu Ala Gly Leu Tyr Asp Lys Ile Trp Gln	
290 295 300	
gca ttt gct gtt tat ctg cca gta aag act gtt ggc gtt caa ggc gac	959
Ala Phe Ala Val Tyr Leu Pro Val Lys Thr Val Gly Val Gln Gly Asp	
305 310 315	
aaa cgg aca cat tca cac gct gtt gct cta cgt gca att aca agt gaa	1007
Lys Arg Thr His Ser His Ala Val Ala Leu Arg Ala Ile Thr Ser Glu	
320 325 330 335	
gac gga atg act gct gac tgg ttt cat ttt gat gga aag ttt ctt gcc	1055
Asp Gly Met Thr Ala Asp Trp Phe His Phe Asp Gly Lys Phe Leu Ala	
340 345 350	
gag gta tca tct aaa atc tgc aac agc gta agg ggt atc aat agg gtg	1103
Glu Val Ser Ser Lys Ile Cys Asn Ser Val Arg Gly Ile Asn Arg Val	
355 360 365	

gta tac gac att acg tct aaa cct cca tca act gtt gag tgg gaa 1148
 Val Tyr Asp Ile Thr Ser Lys Pro Pro Ser Thr Val Glu Trp Glu
 370 375 380

tagacgtcag taatgtattt tggaagtact gttgggttatg acgattcact gcaataactta 1208

acaaactatt ttataacttca aaaa 1232

<210> 4

<211> 382

<212> PRT

<213> Physcomitrella patens

<400> 4

Ile Arg His Glu Ala Thr Ser Thr Gln Gly Asn Ile Ala Ala Ile Glu
 1 5 10 15

Asn Val Asp Ser Arg Ile Tyr Ala Leu Gln Tyr His Pro Glu Val Thr
 20 25 30

His Ser Glu Lys Gly Thr Glu Thr Leu Arg His Phe Phe Leu Asn Val
 35 40 45

Cys Gly Met Lys Ala Asp Trp Gln Met Gln Asn Val Leu Glu Glu Glu
 50 55 60

Ile Lys Lys Val Thr Ala Thr Val Gly Pro Asp Asp His Val Ile Cys
 65 70 75 80

Ala Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser Thr Val Ala Ala Thr Leu Val His
 85 90 95

Arg Ala Ile Gly Asp Arg Leu His Cys Val Phe Val Asp Asn Gly Leu
 100 105 110

Cys Arg Tyr Lys Glu Arg Glu Arg Val Met Ala Thr Phe Val Lys Asp
 115 120 125

Leu His Leu Pro Val Thr Cys Val Asp Ala Thr Glu Gln Phe Leu Ser
 130 135 140

Lys Leu Lys Gly Val Val Asp Pro Glu Arg Lys Arg Lys Ile Ile Gly
 145 150 155 160

Ala Glu Phe Ile Ala Val Phe Asp Glu Phe Ser His Arg Leu Glu Arg
 165 170 175

Glu Ile Gly Lys Met Pro Ala Phe Leu Val Gln Gly Thr Leu Tyr Pro
180 185 190

Asp Val Ile Glu Ser Cys Pro Pro Pro Gly Ser Gly Lys Ser His Ser
195 200 205

His Thr Ile Lys Ser His His Asn Val Gly Gly Leu Pro Glu Asn Met
210 215 220

Lys Leu Lys Leu Val Glu Pro Leu Lys Trp Leu Phe Lys Asp Glu Val
225 230 235 240

Arg Glu Met Gly Ala Leu Leu Asp Val Pro Val Ser Phe Leu Lys Arg
245 250 255

His Pro Phe Pro Gly Pro Gly Leu Ala Val Arg Ile Leu Gly Asp Val
260 265 270

Thr Gln Asp Gly Ala Leu Asp Thr Ile Arg Leu Val Asp Glu Ile Phe
275 280 285

Val Asn Ser Ile Arg Glu Ala Gly Leu Tyr Asp Lys Ile Trp Gln Ala
290 295 300

Phe Ala Val Tyr Leu Pro Val Lys Thr Val Gly Val Gln Gly Asp Lys
305 310 315 320

Arg Thr His Ser His Ala Val Ala Leu Arg Ala Ile Thr Ser Glu Asp
325 330 335

Gly Met Thr Ala Asp Trp Phe His Phe Asp Gly Lys Phe Leu Ala Glu
340 345 350

Val Ser Ser Lys Ile Cys Asn Ser Val Arg Gly Ile Asn Arg Val Val
355 360 365

Tyr Asp Ile Thr Ser Lys Pro Pro Ser Thr Val Glu Trp Glu
370 375 380

